

## UNE MÉTHODE DE DOSAGE DES CHITINASES (1)

PAR

Ch. JEUNIAUX

(Institut Léon Fredericq, Biochimie et Laboratoires de Microbiologie générale  
et médicale, Université de Liège)

---

(1 figure)

---

Certains filtrats stériles de culture d'actinomycète solubilisent la chitine pulvérisée (1). Cette lyse peut être étudiée à l'aide des deux méthodes dont nous exposons les principes ci-dessous.

*Conditions expérimentales.* — Dans des tubes de verre sans défauts et de calibre constant, nous introduisons 1 cc. d'une suspension aqueuse de chitine purifiée et pulvérisée (2), puis 1 cc. d'une solution tampon 0.1 M. Après stérilisation et addition du filtrat enzymatique stérile, nous scellons les tubes à la flamme. Ceux-ci peuvent être couchés afin de réaliser une large surface de contact entre le liquide et la chitine sédimentée. Une action mécanique constante ne favorise pas l'action de l'enzyme.

*Méthode néphélométrique.* — A l'aide du néphélomètre de Pulfrich (filtre vert L2), on peut mesurer le trouble dû à la chitine en suspension. La mesure de trouble est une mesure pratiquement linéaire de la concentration pour des suspensions contenant moins de 0.75 mg. de chitine pulvérisée par cc., en liquide incolore (eau) comme en liquides colorés.

*Méthode chimique.* — Les tubes sont déscellés et la réaction est arrêtée par addition de NaOH chaude (concentration finale 5%). Une ébullition d'une demi-heure solubilise complètement les protéines et n'altère pas la chitine. Après centrifugations et lavages, on minéralise le résidu et on en dose l'azote par la méthode de Kjeldahl.

---

(1) Communication faite à la *Société belge de Physiologie*, Réunion de Liège, 14 avril 1951.

*Résultats.* — Le tableau ci-dessous montre que, en l'absence d'enzyme, le trouble des suspensions de chitine diminue légèrement, indépendamment de la nature des solutions. Les variations de trouble observées en présence d'enzyme peuvent être corrigées en tenant compte de la variation spontanée du témoin. Il montre aussi que, en présence d'enzyme, la variation (en %) du trouble est supérieure à la variation de l'azote.

*Stabilité de la chitine pulvérisée en suspension*

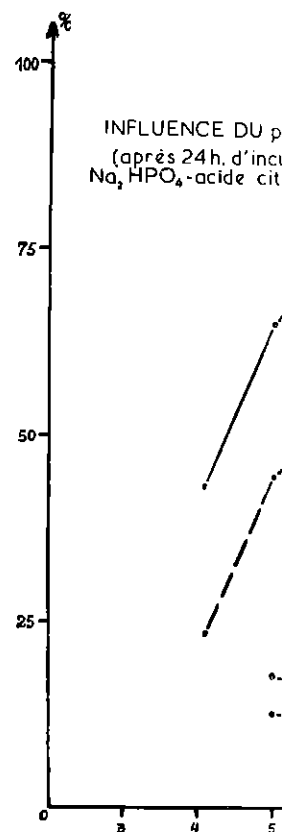
Chitine en suspension dans :	Diminution du trouble (en %)			Diminution de l'azote (en %)
	après 4 h.	après 24 h.		
		non corrig.	corrigé	
eau dist. (témoin) .....	3.5	4	—	0
sol. gélatine (20 mg./cc.) ...	3	3	—	0.6
filtrat culture chauffé <sup>(1)</sup> ...	2	3.4	—	0
filtrat actif <sup>(1)</sup> .....	33	88	84	56.5

<sup>(1)</sup> concentration en azote : env. 0.065 mg./cc.

Cette différence reste néanmoins approximativement constante au cours du déroulement de la chitinolyse et lorsqu'on modifie les conditions expérimentales : la solubilisation de la chitine estimée par dosages d'azote correspond régulièrement aux 2/3 environ de celle estimée par mesures de trouble.

L'allure de la chitinolyse en fonction de la durée d'incubation, du pH et de la température d'incubation, étudiée à l'aide des deux méthodes, est identique (voir fig.).

*Conclusions.* — Le mécanisme de la chitinolyse ne peut pas être précisé à l'heure actuelle. Les deux méthodes permettent d'évaluer l'activité enzymatique du filtrat de culture. La différence systématique entre les résultats fournis par les deux méthodes est probablement due au fait que, au cours de l'hydrolyse, certaines particules ont perdu leurs propriétés optiques et ne contribuent plus à la diffusion de la lumière que nous mesurons, alors qu'elles restent suffisamment grandes pour être recueillies par centrifugation.



La méthode néphélométrique est utilisée pour les mesures de trouble et le fractionnement que nous avons étudié.

Dans l'étude d'une lyse quantitative, il est préférable de mesurer la distribution des produits finaux (50% de tylglycosamine selon KARRER).

BIBLIOGRAPHIE

1. JEUNIAUX, Ch. — *Arch. intern. Hyg. Exp. Appl.*
2. KARRER, P. et HOFMANN, A.
3. ZECHMEISTER, L. et TOTH, G.
4. KARRER, P. et VON FRANCOIS, G.

ous montre que, en l'absence de chitine diminue légèrement, solutions. Les variations de yme peuvent être corrigées en née du témoin. Il montre aussi iation (en %) du trouble est

érisée en suspension

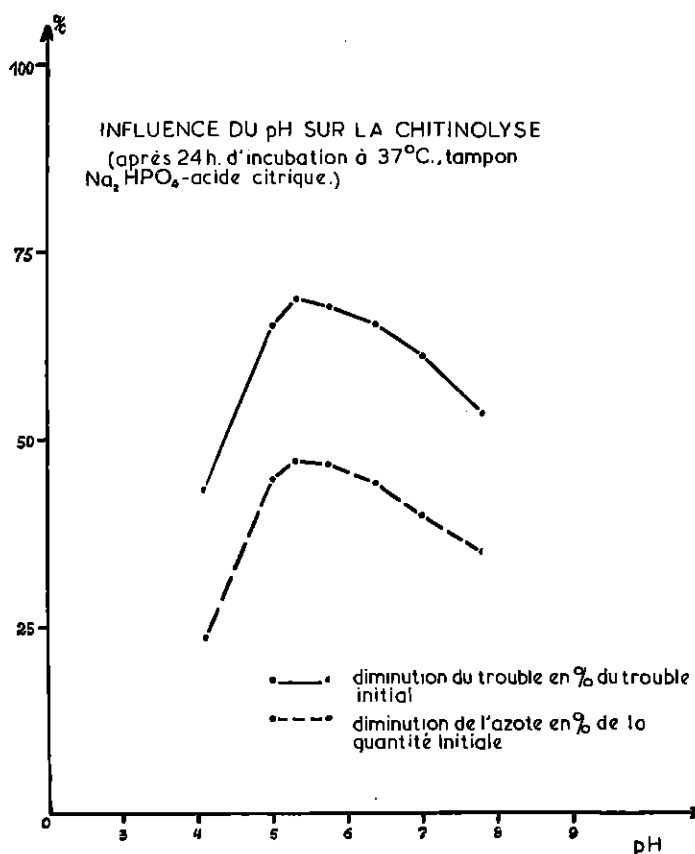
Diminution du trouble (en %)		Diminution de l'azote (en %)
après 24 h.		
non corrigé	corrigé	
4	—	0
3	—	0.6
3.4	—	0
88	84	56.5

mg./cc.

approximativement constante lyse et lorsqu'on modifie les ilisation de la chitine estimée ilièrement aux 2/3 environ de e.

tion de la durée d'incubation, tion, étudiée à l'aide des deux

la chitinolyse ne peut pas être méthodes permettent d'évaluer culture. La différence systé- r les deux méthodes est proba- 'hydrolyse, certaines particules et ne contribuent plus à la esurons, alors qu'elles restent eillies par centrifugation.



La méthode néphélométrique, plus rapide, semble pouvoir être utilisée pour les mesures courantes d'activité enzymatique au cours du fractionnement que nous nous proposons d'entreprendre.

Dans l'étude d'une lyse qui peut être le résultat d'une succession de réactions catalysées par des enzymes différents (3), il nous paraît préférable de mesurer la disparition du substrat plutôt que l'apparition des produits finaux (50 à 80 % récupérables sous forme d'acétylglucosamine selon KARRER, 2, 4).

BIBLIOGRAPHIE

1. JEUNIAUX, Ch. — *Arch. internat. Physiol.*, 1950, **58**, 352.
2. KARRER, P. et HOFMANN, A. — *Helv. Chim. Acta*, 1929, **12**, 166.
3. ZECHMEISTER, L. et TOTH, G. — *Enzymologia*, 1939, **7**, 165.
4. KARRER, P. et VON FRANÇOIS, G. — *Helv. Chim. Acta*, 1929, **12**, 986.